

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費
「学内共同研究等」

生活習慣病、腎尿路系疾患における IRAP/AT4 のマーカーとしての臨床応用

研究代表者： 此下 忠志（医学部・准教授）、横山 修（医学部・教授）

共同研究者： 宮森 勇（医学部・教授）、牧野 耕和（医学部・大学院生）

概 要	
	DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析により、高血圧や糖尿病に特有な発現変動遺伝子群をクラスター解析し、C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 (LNPEP) など、レニン-アンジオテンシン系遺伝子群が抽出された。RT-PCR を用いた解析で、IRAP/AT4 (LNPEP) の発現変化が示唆された。IRAP/AT4 (LNPEP) は受容体型アミノペプチダーゼであり、遺伝子の構造から約 800 アミノ酸配列分が Soluble form となると想定された。3 か所の抗体作製イデオタイプ部位を設定し抗体を作成した。標準品をもちいて検量線の作製を試みたところ、ELISA としての測定系が成立することがほぼ確認された。今後のバイオマーカーとして臨床応用に向けて、一次抗体反応時間、二次抗体反応時間、発色反応時間、反応温度、検量線段階希釈濃度などの適正化を進めている。
関連キーワード	網羅的発現遺伝子解析、レニン-アンジオテンシン系、AT4、IRAP、LNPEP

研究の背景および目的

腎組織 RNA を用い、55,000 遺伝子転写物の網羅的解析により、生活習慣病・腎尿路系疾患で特異的に変動するクラスターを抽出した。特異的な発現変化を示す遺伝子クラスター No 11 の Gene Ontology 解析と Pathway 解析により C9orf3、ACE2、IRAP/AT4 などが抽出された（図1）。

正常腎と糖尿病/高血圧腎のクラスター解析

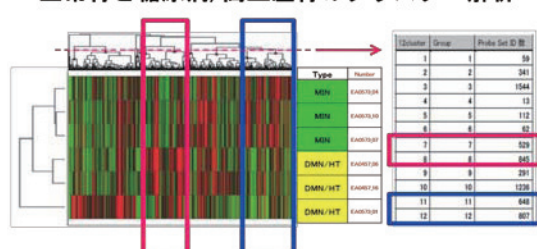


図1

抽出された個別の遺伝子について RT-PCR 法を用い評価し、糖尿病/高血圧において IRAP/AT4 (LNPEP) の発現変化が示唆された（図2）。

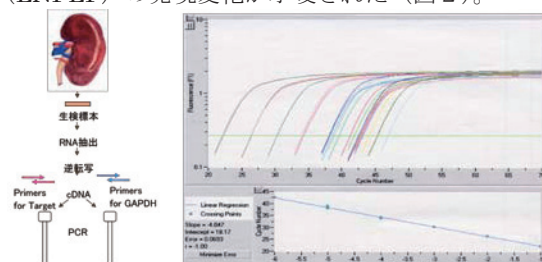


図2

この IRAP/AT4 は受容体型酵素であり。構造か

ら Phe154 と Ala155 の間で分解され、約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定される（図3）。

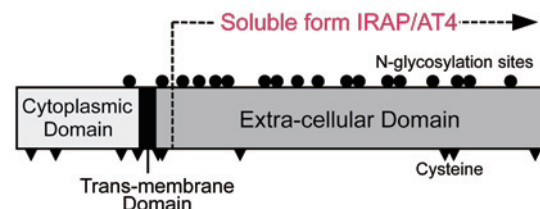


図3

可溶性部分のアミノ酸配列 3 か所の抗体作製用イデオタイプ部位を各 19 残基で設定し、家兎を免疫し、3 イデオタイプの抗体を作成した（図4）。

LNPEP(IRAP/AT4)の抗体作製部位

1 MEPTTNDRLQ LPRNMIENSM FEEEPDVVDL AKEPCLHPL E PDEVEYEPRG SLLVVRGLGE
61 HEMEEDEEDY ESSAKLLGMS FMNRSSGLRN SATGYRQSPD GACSVPSART MVVCAFWV
121 AVSVMVYL LPRCTETKEG CHKNKGISGL IQPEATNGKL FPWAGIRLPT AVVPLRYELS
181 LHPILTSMTF RGSVTSVQA LQVYTNILH STGNISRYT FMSAVSQEK QAEILEYVH
241 GQIAVAPEA LLAGHNYTLK IEYSANISS YYGFGFSYT DESNEKCYFA ATQFEPLAAR
301 SAFFPCDEPA FKATFIKI RDEQYALSN MPKSSVVDL DGLVDFE SVKMSTLYVA
361 FNGEMKNLS QDVNGTLVSI YAVPEKGVV HYALETTVLK LEFGNYFEI GYPLKKDLV
421 AIPDFEAGAM ENWGLITFRE ETLVYDNTS SMADRLVTK IIAHELAWQ FQNLVTMRWW
481 NDVLNKGFA TFMEYFSLEK IFKELSSYED FLDAFPKTMK KDSLNSSHPH SSSVQSSEQI
541 EEMFDLSYF KGSSLLMLK TYLSEDFQH AVVLYLHNS YASIQSDWL DSNFVETNOT
601 LDVRRMKTW TLQKGFPLYT VQKKGKELF QGERFLNMK PEIQSDTSY LWHIPLSYF
661 EGRNYSKYQS VSLLOKSGV ILTTEVLVW KYNINMGYY VHYADDOWE ALIHLKMP
721 YVLSKDRAN LNNIFELAG LGKVPLKRAF DLNLYGNEN HTAPITEALF QTDLYNLE
781 KLYMDLASR LVTRVFKLLQ NQIQQTWTD EGTPSMRELK SALLEFACH NLGNCSTTAM
841 KLFDWMASIN GTQSLPDMV TTVKVGAKT DKGSWFLGK YISGSSEAK NKILEALSS
901 EDVRKLYWLM KSSLNGDNFR TOKLSPIRT VGRHFFGLH AWDFYKENWN KLVQKPLGS
961 YTIQIVAGS TYLFTKTHL SEVQAFENQ SEATFLRCV GEALEVIQNL IQWMEKNLS
1021 LTWWL

図4

作製した抗体を用い、標準品による検量線の作製を試みたところ、ペプチド 276 と 611 の組み合わせで ELISA の測定系が成立することが期待された。そこでキットを作成し、測定条件を適正化する。

研究の内容および成果

二抗体法による ELISA の測定系としてのキットが作製された (図 5)。



図 5

実際の測定では左端列を検量線用標準品の希釈段階とし有効な発色が確認された (図 6)。

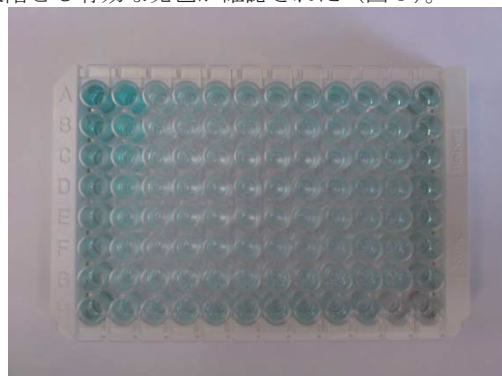


図 6

プレートリーダーによる測定で、極めて精度の高い測定が可能であることが確認された (図 7)。

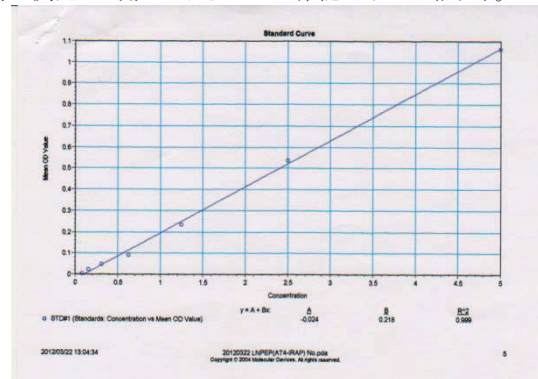


図 7

また duplicate sample での CV 値も低く、測定感度にかかる検体での測定間の相関も悪くないと考えている。しかしこれまでの測定で実際の血漿での濃度はかなり低めであることが想定される。そこで、一次抗体反応時間、二次抗体反応時間、発色反応時間、反応温度、検量線段階希釈濃度などについて様々な組み合わせを試み、測定法の適正化を進めている。

今後、測定法の適正化が完了すれば、千例規模でストックしている血漿、尿を用いて、疾患の有無や病期におけるバイオマーカーとしての意義を検討する。バイオマーカーとしての可能性を検討する。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Konoshita T*, et al. A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types calcium channel blockers. *Int J Cardiol* 2011. 11.21. [Epub ahead of print]

Fujii M, Konoshita T, et al. Aldosterone inhibits endothelial morphogenesis and angiogenesis through the downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression subsequent to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129: 145-152, 2012

Tanaka T, Konoshita T, et al. The Differences in the Involvements of Loci of Promoter Region and Ile50Val in Interleukin-4 Receptor α Chain Gene between Atopic Dermatitis and Japanese Cedar Pollinosis. *Allergol Int* 61:57-63, 2012

Konoshita T* Do genetic variants of the Renin Angiotensin system predict blood pressure

response to Renin-Angiotensin system-blocking drugs? : A systematic review for pharmacogenomics in the Renin Angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 13: 356-361, 2011

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 22～24 年度 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C) 22590909 網羅的発現遺伝子解析により抽出された高血圧関連遺伝子 A T 4 / I R A P の役割